

铁皮石斛 *SAPK* 基因家族鉴定及表达模式分析

姚馨怡, 赵佳莹, 胡素影, 李娴, 庞群群, 俞振明*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

姚馨怡, 赵佳莹, 胡素影, 李娴, 庞群群, 俞振明. 铁皮石斛 *SAPK* 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1195-1210.

YAO Xinyi, ZHAO Jiaying, HU Suying, LI Xian, PANG Qunqun, YU Zhenming. Identification and expression profiling of *SAPK* gene family members in *Dendrobium officinale*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1195-1210.

摘要: 为研究铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, *SAPK*)基因家族的功能, 综合多种生物信息学技术鉴定铁皮石斛 *SAPK* (*DoSAPK*)家族成员, 分析它们的理化特性、染色体定位、系统进化树、基因结构和启动子顺式作用元件等, 并通过荧光定量 PCR 技术检测它们在不同组织、低温处理及盐胁迫处理后的表达量。结果表明, 铁皮石斛有 8 个 *SAPK* 家族成员, 分为 group I、group II 和 group III 亚家族, 分布在 7 条染色体上, 且 2 对基因间存在复制关系。在同一亚族中的家族成员具有类似的基因结构、保守基序和蛋白质二级结构。*DoSAPK* 家族基因的启动子区域富含大量激素响应和胁迫应答相关的调控元件。不同 *DoSAPK* 成员在铁皮石斛各组织中均有不同程度的表达, 具有组织表达特异性。在低温和盐胁迫处理下呈现差异化表达, 可能受到低温和盐胁迫的调控, 特别是 *DoSAPK1* 在铁皮石斛逆境应答过程中可能起着重要的作用。本研究为铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因及其功能的深入研究提供了参考。

关键词: 铁皮石斛; *SAPK* 家族; 基因表达; 非生物胁迫

Identification and expression profiling of *SAPK* gene family members in *Dendrobium officinale*

YAO Xinyi, ZHAO Jiaying, HU Suying, LI Xian, PANG Qunqun, YU Zhenming*

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, Zhejiang, China

Abstract: To investigate the potential roles of stress-activated protein kinase (*SAPK*) gene family

资助项目: 国家自然科学基金(32000257); 大学生创新创业训练计划(202310344015, S202310344070); 浙江省自然科学基金(LY23H280003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32000257), the Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (202310344015, S202310344070), and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY23H280003).

*Corresponding author. E-mail: yuzhenming@zcmu.edu.cn

Received: 2023-10-23; Accepted: 2024-02-05

members in *Dendrobium officinale*, we employed multiple bioinformatics methods to identify the members of this family. The physicochemical properties, chromosomal localization, phylogenetic relationship, gene structure, and *cis*-acting elements of each *D. officinale* SAPK (DoSAPK) member were analyzed. In addition, their expression profiles in different tissues and under the low-temperature or salt stress treatment were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that *D. officinale* carried eight DoSAPK family members, which belonged to three groups (groups I, II, and III). These genes were located on seven chromosomes, and there were two pairs of genes with replication. The DoSAPK members within the same group had similar gene structures, conserved motifs, and secondary structures. The *cis*-acting elements in the promoter regions of DoSAPK genes included abundant hormone and stress response elements. DoSAPK family members presented tissue-specific expression in *D. officinale*. Furthermore, they were differentially expressed under the low-temperature or salt stress treatment, which suggested that they might be involved in the responses to low-temperature and salt stress. Intriguingly, DoSAPK1 might play a role in the abiotic stress responses. The results laid a foundation for in-depth study of the members and roles of the DoSAPK gene family.

Keywords: *Dendrobium officinale*; SAPK family; gene expression; abiotic stress

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为多年生草本药用植物,具有滋阴清热、益胃生津等功效,是我国传统珍稀中药材。在自然条件下,铁皮石斛生长缓慢,主要附生于一些高大乔木、阴湿的树干或石灰岩上,喜欢温暖、湿润的环境,对生长环境和气候条件的要求都十分苛刻^[1]。长期以来,铁皮石斛主要依赖其野生资源,但由于铁皮石斛自然结实率低(不到 5%)、品质退化严重、生长周期偏长等问题,野生铁皮石斛已濒临灭绝^[2]。因此,如何提高铁皮石斛耐低温、抗干旱等适应逆境的能力,从而提高其产量和品质始终是研究的热点。

蔗糖非发酵相关蛋白激酶(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase, SnRK)是一类植物特异存在的丝氨酸-苏氨酸类蛋白激酶,依据其蛋白质序列的相似性和结构域的保守性,可分为 3 个亚家族:SnRK1、SnRK2 和 SnRK3^[3]。SnRK2 可被高渗透胁迫诱导,又称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK),在脱落酸(abscisic acid, ABA)信

号通路中起核心作用^[4-5]。ABA 不仅调控植物生长发育,也在低温、盐渍等过程中起到关键作用。ABA 信号传导过程中,缺失 ABA 的情况下,ABA 受体吡咯菌素耐药性 1 (pyrabactin resistance 1-like, PYR1/PYL1)蛋白不能与蛋白磷酸酯酶 2C (protein phosphatase 2C, PP2C)结合,阻止了 SAPK 被激活;存在 ABA 的情况下,ABA 受体 PYR/PYL 与 A 型 PP2C 相互作用,进而解除 PP2C 对 SAPK 的抑制作用, SAPK 可激活下游底物靶点,促进植物抵抗逆境^[6-7]。

近年来, SAPK 基因家族已在多种植物中被鉴定,例如拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]^[8]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[9]、黑麦草 (*Lolium perenne* L.)^[10]、薄壳山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]^[11]等。在拟南芥中鉴定的 10 个 SAPK 基因中,有 9 个 (AtSnRK2.9 除外)成员能被甘露醇及 NaCl 造成的高渗透胁迫诱导,其中 AtSnRK2.1、AtSnRK2.4、AtSnRK2.5、AtSnRK2.9 和 AtSnRK2.10 隶属于不被 ABA 激活的成员^[12]; AtSnRK2.2、AtSnRK2.3 和

AtSnRK2.6 是强烈响应 ABA 信号通路的关键正调控因子,通过磷酸化下游的细胞分裂素负调节子(*Arabidopsis response regulator 5*, ARR5),参与细胞分裂素和 ABA 信号串扰和植株抗旱性^[13]。AtSnRK2.8 磷酸化转录因子 NAC62 调控代谢过程,也受假单胞菌诱导,参与植物免疫过程^[14]。AtSnRK2.4 和 AtSnRK2.10 主要通过调控水通道蛋白的转录水平来改善根系构造,维持高水平光合作用和缓解氧化损伤,从而提高拟南芥的耐盐胁迫水平^[15]。AtSnRK2.4、AtSnRK2.6、AtSnRK2.7 及 AtSnRK2.9 还能显著响应低温胁迫^[16]。在水稻中获得的 10 个 *SAPK* 基因被证实均能被渗透胁迫诱导,OsSAPK2 可上调抗氧化酶相关基因的转录水平,促进气孔关闭,增强活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除能力,从而提高水稻的抗旱能力^[17]; OsSAPK6 是耐冷性正调控因子,可磷酸化水稻理想株型蛋白(ideal plant architecture 1, IPA1),并促进其表达,激活 OsSAPK6-IPA1-OsCBF3 级联信号,提高水稻的耐冷性^[18]。然而截至目前对 *SAPK* 家族蛋白的研究主要聚焦于模式植物,铁皮石斛 *SAPK* (*DoSAPK*)基因家族及其成员的表达特征尚不清楚。

为研究 *SAPK* 蛋白在铁皮石斛生长发育及逆境应答中的生物学功能,本研究基于铁皮石斛染色体级别的基因组^[19],利用生物学信息学方法,对铁皮石斛 *SAPK* 基因家族进行了全基因组鉴定,并对它们的理化性质、保守基序、进化关系、染色体定位及在不同组织器官、低温处理、盐胁迫处理下的表达水平进行了分析,为进一步研究铁皮石斛 *SAPK* 蛋白的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

铁皮石斛(*D. officinale*)采收自浙江中医药

大学药用植物园温室(E 119.89°, N 30.08°),于 2022 年 6 月开花期间采摘根、茎、叶、花等不同器官,分析 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因在不同组织的表达水平。铁皮石斛组培苗培养条件与先前报道一致^[20],将 6 月龄的组培苗转接至 250 mmol/L NaCl 的 1/2 Murashige & Skoog (MS)培养基中,在(25±2) °C、12 h/12 h (光照/黑暗交替)、光照强度为 100 mmol/(m²·s)的人工气候室中培养,分别在 0、4、12 h 后收集铁皮石斛的叶和根^[21],分析 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因响应盐胁迫的表达量。将 60 株组培苗转移至 0 °C 培养箱,以 25 °C 培养的组培苗为对照,6 h 后收集叶片,分析 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因响应低温的表达量。以上样品经液氮速冻后,保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 *DoSAPK* 基因家族的挖掘与鉴定

在国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/>)下载已发表的 10 条水稻 *SAPK* 蛋白序列当作种子序列,在铁皮石斛基因组^[19]中采用 BLAST 比对方法(E -value<1e-5)获取 *SAPK* 同源序列。利用 NCBI-CDD 平台^[22]对所得到的同源序列进行二次筛选并确定候选 *SAPK*,并对 *SAPK* 蛋白的保守结构域进行完整性检测,通过 Pfam 平台(<https://pfam.xfam.org>)得到 *SAPK* 的保守结构域(PF00069),通过 HMMER3.0 程序^[23],验证铁皮石斛基因组中的 *SAPK* 候选成员。最终确定 8 个 *SAPK* 家族成员,据其在染色体上的位置命名为 *DoSAPK1-DoSAPK8*。

1.3 分析 *DoSAPK* 蛋白的理化特性、二级结构、基因分布及亚细胞定位

通过 ExPASy 门户网站(www.expasy.org)计算铁皮石斛 *DoSAPK1-DoSAPK8* 的氨基酸长度、蛋白分子量、理论等电点、不稳定性指数、脂溶指数和总平均亲水性等理化特性。利用 WoLF PSORT 预测网站(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)推

断 DoSAPK1-DoSAPK8 蛋白在亚细胞器的分布。利用工具 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 预测 DoSAPK1-DoSAPK8 蛋白的二级结构。依据铁皮石斛基因组注释信息判定 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因在染色体上的分布情况, 借助 TBtools 程序^[24]将 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因锚定在相应染色体上, 绘制 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因的染色体分布。

1.4 构建铁皮石斛 DoSAPK 家族成员的系统发育进化树

利用 Phytozome 公共平台(www.phytozome.net) 获取拟南芥、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、绿豆(*Vigna radiata*)、玉米(*Zea mays*)、藜麦(*Chenopodium quinoa*)、水稻中已公布的 SAPK 氨基酸序列, 据此绘制系统发育进化树。采用 ClustalX 软件(www.clustal.org/)对铁皮石斛、拟南芥、水稻、绿豆、马铃薯、玉米、藜麦中的 71 个 SAPK 蛋白序列进行多重序列比对, 通过 MEGA X 软件^[25]的邻近法(neighbor joining, NJ)建立铁皮石斛 SAPK 家族成员的系统发育进化树, 步长(bootstrap)值设定为 1 000, 其余参数设为默认。

1.5 分析铁皮石斛 DoSAPK 家族蛋白的保守基序及基因结构

采用 MEME 线上工具(<https://meme-suite.org>) 检索铁皮石斛 DoSAPK1-DoSAPK8 蛋白序列的保守基序(motif), 将 motif 检索数目设为 10, 利用 TBtools 程序^[24]标识保守基序的分布位置及数量。

根据铁皮石斛基因组的注释信息搜索 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因中非编码区(untranslated regions, UTR)和外显子(exon)的数量及分布情况, 通过 GSDS2.0 在线网站(<http://gsds.gao-lab.org/>)将铁皮石斛 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因的结构图谱进行可视化。

1.6 预测铁皮石斛 DoSAPK 家族基因启动子区域的顺式作用元件

通过 PlantCARE 公共平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测铁皮石斛 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因上游 2 000 bp 区域的顺式作用元件, 借助 TBtools 程序^[24]对逆境响应相关顺式作用元件进行可视化。

1.7 分析铁皮石斛 DoSAPK 家族基因在不同组织器官的表达情况

为研究铁皮石斛 SAPK 基因家族在不同组织器官的表达模式, 从 NCBI 下载铁皮石斛茎、叶、根、花蕾、萼片、唇瓣、花粉、合蕊柱、根尖、气生根的 RNA-seq 数据^[26], 通过 HISAT、StringTie 和 Ballgown 软件^[27]组装与评估转录本, 并获得铁皮石斛在不同组织器官的表达量, 最终利用 TBtools 软件^[24]可视化 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因的表达水平。

1.8 分析铁皮石斛 DoSAPK 家族基因在低温及盐胁迫处理下的表达情况

按照通用植物 RNA 提取试剂盒(多糖/多酚系列, 北京华越洋生物科技有限公司)操作说明书依次提取受低温及盐胁迫处理铁皮石斛根或叶的总 RNA^[28], 采用 NanoDrop2000 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测定所得总 RNA 的浓度和质量。根据 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)操作说明书逆转录生成第一链 cDNA, 产物用于检测 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因响应低温及盐胁迫处理下的表达情况。

以铁皮石斛延长因子(elongation factor 1 alpha, *EF-1 α*)为管家基因^[29], 通过 Primer Premier 5.0 生成 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因的荧光定量 PCR 引物(表 1)。将低温及盐胁迫处理下铁皮石斛根或叶的 cDNA 浓度定量为 50 ng/ μ L, 根据荧光染料 iTaq™ universal SYBR® Green (Bio-Rad Laboratories)说明书, 配制 10 μ L 的反应体系: 5 μ L 的 iTaq™ SYBR® Green supermix,

1 μL 50 ng/ μL 的模板, 1 μL 10 mmol/L 的上/下游引物, 3 μL 灭菌水。溶液平衡后置于 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)中依次进行: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[30]计算铁皮石斛 *DoSAPK1-DoSAPK8* 在低温及盐胁迫处理下的相对表达量, 每个处理的样品含 3 个生物学重复, 通过 Student's *t*-test 比较处理组与对照组间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛 *DoSAPK* 基因家族的鉴定及理化特性分析

综合多种生物信息学技术, 在染色体级别的铁皮石斛基因组中鉴定得到 8 个 *SAPK* 家族成

员, 根据它们所在的亚家族类群及染色体上的位置依次命名为 *DoSAPK1-DoSAPK8* (表 2)。ExPASy 分析结果发现, 8 个铁皮石斛 *DoSAPK* 成员的氨基酸长度介于 226–387 aa, 最大的为 *DoSAPK4*; 蛋白分子量为 25.97–44.66 kDa, 平均分子量为 38.66 kDa; 理论等电点介于 4.66–8.50 之间, 平均值为 5.74; 不稳定性指数介于 34.16–53.53, 脂溶指数介于 77.11–89.82; *DoSAPK1-DoSAPK8* 蛋白均具有较强的亲水性, 以 *DoSAPK2* 蛋白的亲水性最强。亚细胞定位预测显示, 8 个 *DoSAPK* 成员均定位在细胞质。

2.2 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因的染色体定位分析

根据铁皮石斛全基因组注释结果, 绘制了 *DoSAPK* 家族成员的染色体定位图谱(图 1A)。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
EF-1 α	GCTTGAGAAGGAGCCCAAGT	CCAACAGCCACAGTTTGTCTG
DoSAPK1	TCCAGACTATGTGAGGGTATCA	ACCAAGGGTGTTCCTTATCTC
DoSAPK2	GGAATCCACCTACCTCAATCAC	CTCTTCCTCCTCCTCTTCATCT
DoSAPK3	GGACATTGGGTCTGGTAACTT	CCACATTCTCGTCGATCTTCTT
DoSAPK4	GTGATGCTTGTAGGAGGCTATC	GGGTATGGTGTACTGAACTGAC
DoSAPK5	CATGACAGCGATCGATACGAG	GCTCCATGGTCTGCTTATCTC
DoSAPK6	CCCAGCTTATATAGCACCAGAG	GGATATGATCCCACCAGCATTA
DoSAPK7	CATCTTCTCTCCCGGATCTTTG	ACTGCCTGTGCTATTTCAGTTA
DoSAPK8	TGTATCTCCCGAGTGTAGACAT	GATCAGCAGGGAGGTTCTTTAG

表 2 铁皮石斛 *DoSAPK* 蛋白的理化特性分析

Table 2 Physicochemical properties of *DoSAPK* proteins in *Dendrobium officinale*

Protein name	Number of amino acid (aa)	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	Instability index	Aliphatic index	Grand average of hydropathicity	Subcellular localization
DoSAPK1	341	39.04	5.62	43.03	87.98	-0.30	Cytoplasm
DoSAPK2	359	41.39	5.58	46.50	82.84	-0.58	Cytoplasm
DoSAPK3	226	25.97	8.50	35.53	87.12	-0.26	Cytoplasm
DoSAPK4	387	44.66	5.17	53.53	77.11	-0.57	Cytoplasm
DoSAPK5	330	37.59	4.66	37.05	89.82	-0.19	Cytoplasm
DoSAPK6	334	37.87	5.69	34.16	86.98	-0.42	Cytoplasm
DoSAPK7	361	41.60	5.81	45.84	82.33	-0.56	Cytoplasm
DoSAPK8	363	41.17	4.90	35.84	87.30	-0.25	Cytoplasm

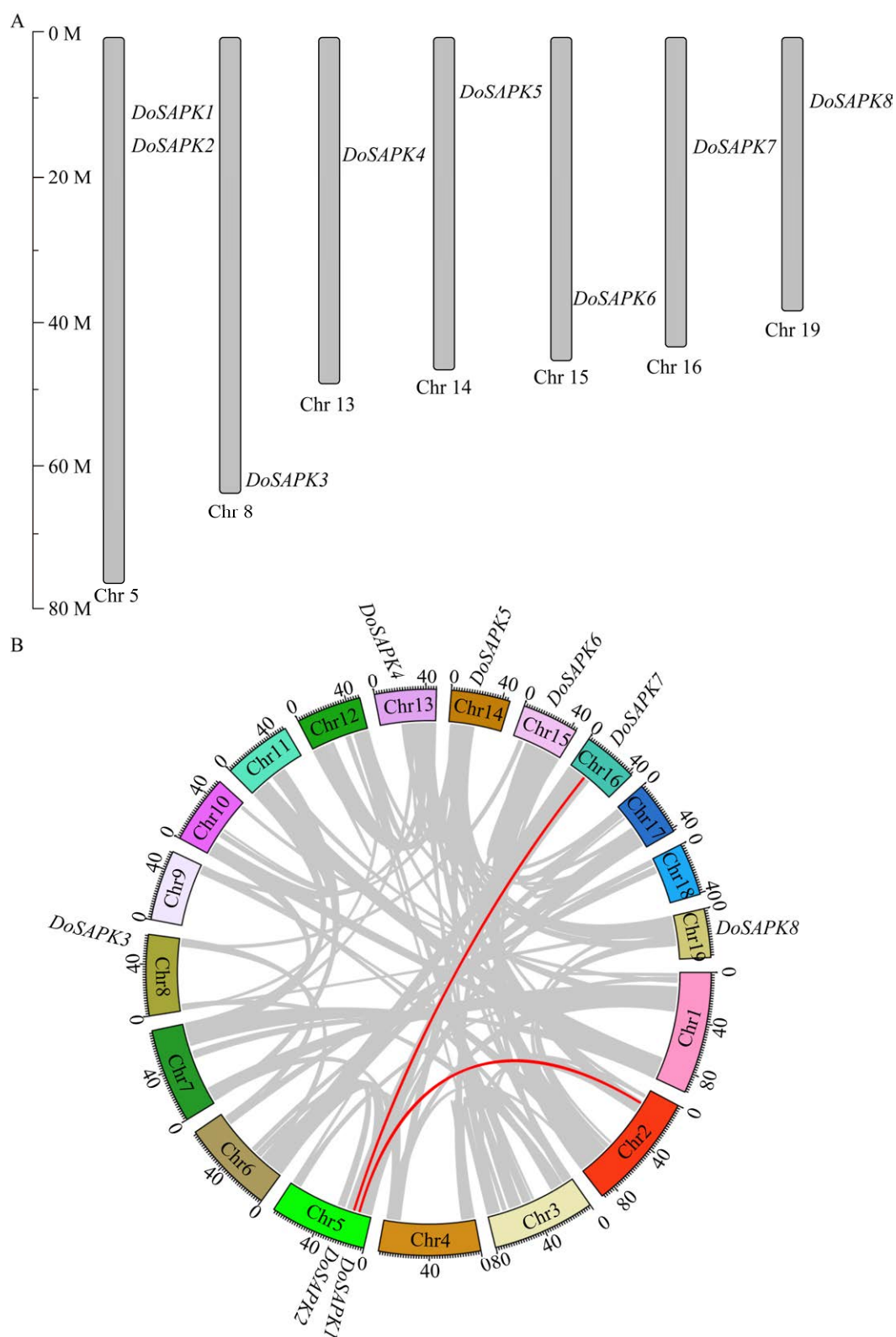


图 1 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族成员的染色体定位(A)及基因复制事件分析(B)

Figure 1 Chromosomal localization (A) and replication events (B) of the *DoSAPK* family in *Dendrobium officinale*.

结果显示, 8 个 *DoSAPK* 成员分布在 Chr5、Chr8、Chr13、Chr14、Chr15、Chr16 和 Chr19 这 7 条染色体上, Chr5 染色体上有 2 个 (*DoSAPK1*、*DoSAPK2*), 其余染色体上均存在 1 个成员。

进一步研究了 *DoSAPK* 家族基因间的共线性关系(图 1B), 结果显示, 铁皮石斛染色体间存在有 2 条共线性关系, *DoSAPK2* 和 *DoSAPK7* 存在物种内共线关系, 推测 *DoSAPK* 家族成员在进化过程中可能发生了基因复制事件。

2.3 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族成员的系统发育树分析

为了分析 *DoSAPK* 家族蛋白的系统进化关系, 通过 MEGA 软件绘制了铁皮石斛、拟南芥、水稻、绿豆、马铃薯、玉米、藜麦中的 71 条 *SAPK* 蛋白序列的系统发育树(图 2), 结果显示, 所有 *SAPK* 蛋白主要分为 group I、group II 和 group III 这三大分支, 4 个成员(*DoSAPK2*、*DoSAPK3*、*DoSAPK4*、*DoSAPK7*)隶属 group I, 2 个成员(*DoSAPK5*、*DoSAPK8*)隶属 group II,

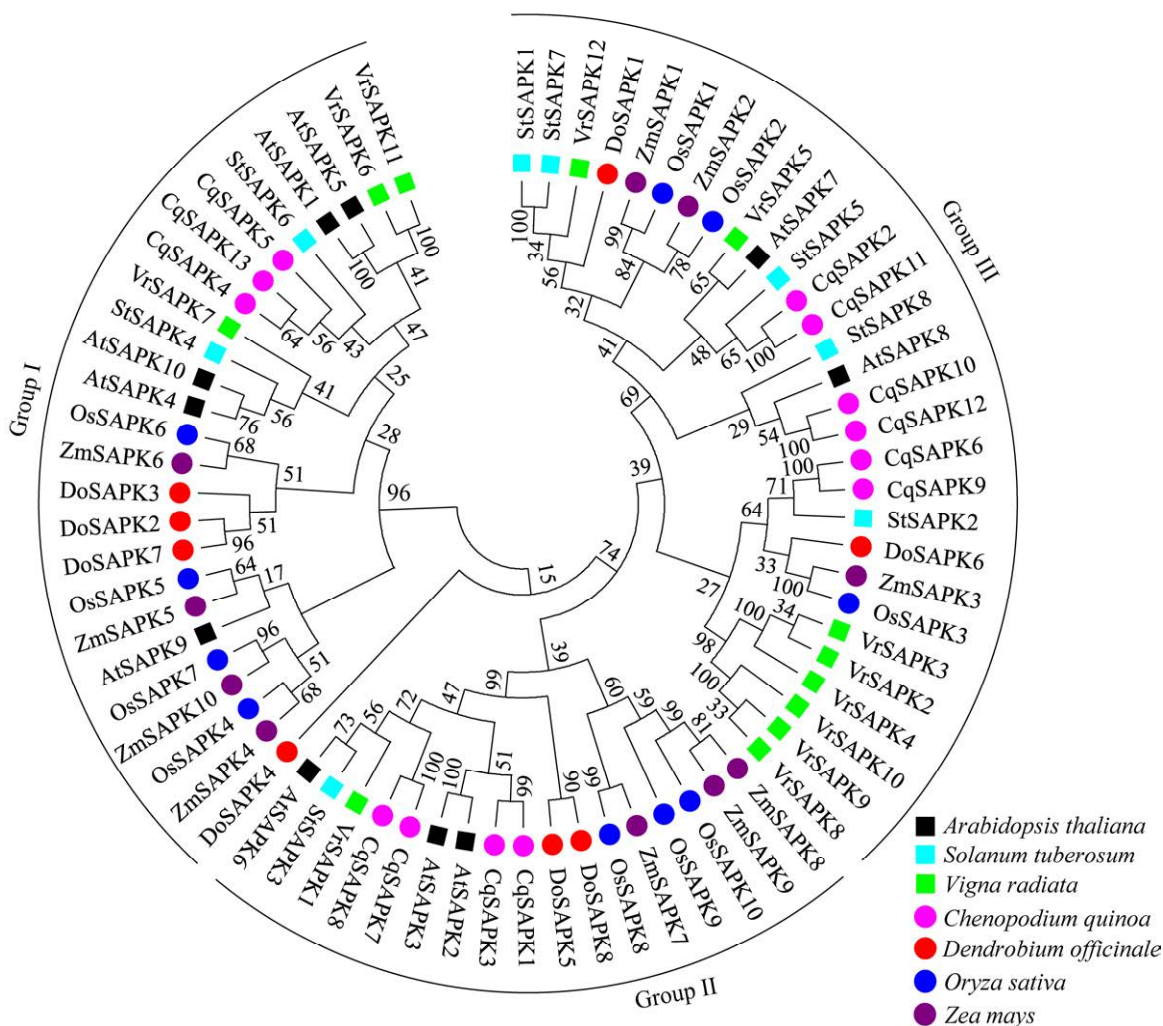


图 2 铁皮石斛、拟南芥、水稻、绿豆、马铃薯、玉米、藜麦 *SAPK* 家族成员的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of *SAPK* family members in *Dendrobium officinale*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Vigna radiata*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, and *Chenopodium quinoa*.

2个成员(DoSAPK1、DoSAPK6)隶属 group III。铁皮石斛 DoSAPK 蛋白与单子叶植物水稻、玉米、藜麦 SAPK 蛋白的亲缘关系较近,与双子叶植物拟南芥、马铃薯、绿豆中 SAPK 蛋白的亲缘关系较远,这可能是因为植物 SAPK 蛋白较为保守地存在单子叶植物与双子叶植物中,独立进化出相对平行的2个分支。

2.4 铁皮石斛 DoSAPK 家族成员的保守基序和基因结构分析

基于铁皮石斛全基因组的注释文件,绘制了 DoSAPK 家族成员的基因结构(图 3A),结果显示,2个成员(DoSAPK2、DoSAPK3)不含非编码区,DoSAPK5 不含 3'-UTR,其余成员均含有 3'-UTR 和 5'-UTR。所有 DoSAPK 家族成员含 4-9 个外显子,DoSAPK6 长度达到 33 500 bp,

含有 9 个外显子和 2 个 UTR,而 DoSAPK1 长度仅为 3 936 bp,也含有 9 个外显子和 2 个 UTR。

铁皮石斛 DoSAPK 家族成员中鉴定到 10 个保守基序(图 3B-3C),结果显示,所有 DoSAPK 家族成员含有 6-10 个保守基序,均具有 motif 1、2、3、6 和 8,DoSAPK8 含有 10 个保守基序,DoSAPK3 含有 6 个保守基序,motif 9 仅分布在 group II 的 DoSAPK5 和 DoSAPK8 中。

2.5 铁皮石斛 DoSAPK 家族成员的二级结构分析

通过 SOMPA 软件分析了 DoSAPK 家族蛋白的二级结构(表 3),结果显示,DoSAPK 家族蛋白均含有 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和随机卷曲 4 种二级结构类型,所占比例大小依次为

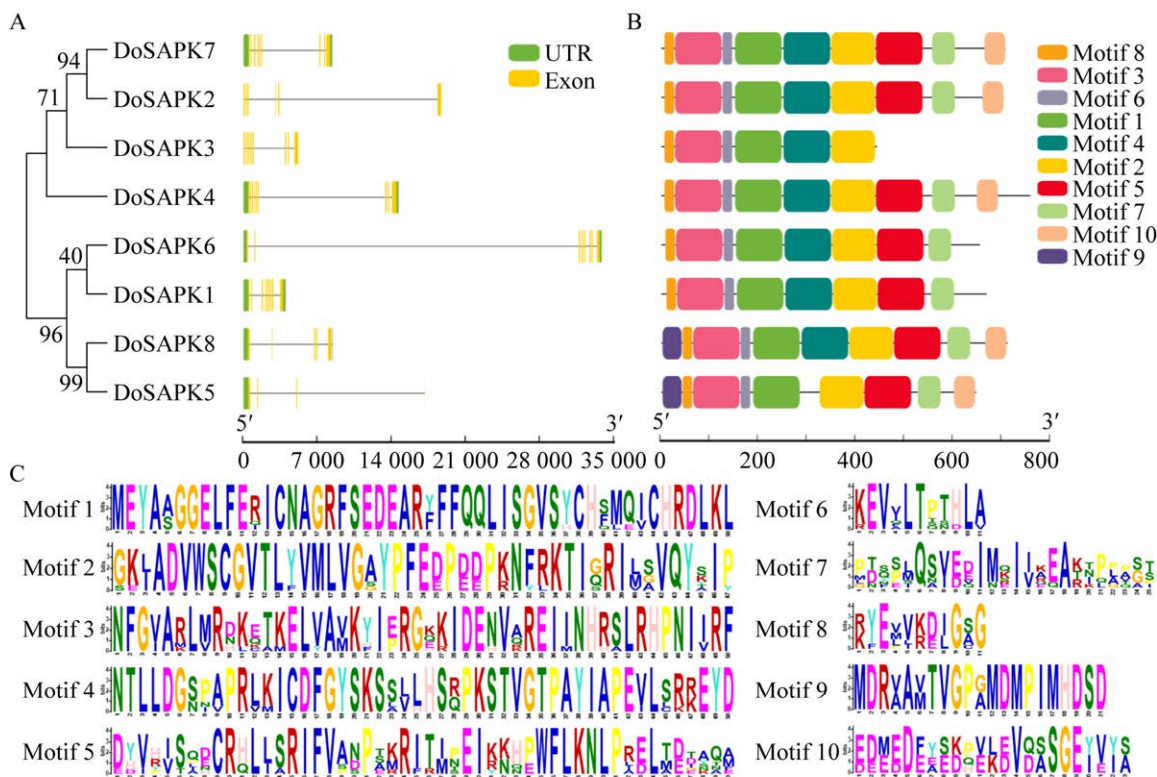


图3 铁皮石斛 SAPK 家族成员的基因结构(A)、保守基序(B)及基序标识(C)

Figure 3 Gene structure (A), conserved motifs (B), and logo (C) analysis of DoSAPK family in *Dendrobium officinale*.

α -螺旋(平均 39.50%)、随机卷曲(平均 39.25%)、延伸链(平均 15.59%)和 β -折叠(平均 6.67%)。DoSAPK7 的 α -螺旋占比 (44.32%) 最高，DoSAPK3 的延伸链占比 (19.03%) 最高，DoSAPK5 的 β -折叠 (6.67%) 占比最高，DoSAPK1 的随机卷曲(47.51%)占比最高。

2.6 铁皮石斛 DoSAPK 家族蛋白的序列同源性及其互作关系分析

蛋白序列一致性比对结果表明，DoSAPK2 和 DoSAPK7 间的一致性最高，达 95.58%，其次是 DoSAPK3 和 DoSAPK7 (94.25%)、

DoSAPK4 和 DoSAPK7 (93.81%)、DoSAPK2 和 DoSAPK3 (93.36%)、DoSAPK2 和 DoSAPK4 (92.04%)、DoSAPK5 和 DoSAPK8 (78.32%)，同一亚家族成员之间的蛋白一致性较高(图 4A)。

蛋白质互作分析显示，8 个 DoSAPK 家族蛋白间存在互作关系，尤其是 DoSAPK5 和 DoSAPK6 互作指数较高，并与下游 PP2C6、PP2C30、PP2C50、脱落酸不敏感 5 (abscisic acid insensitive 5, ABI5)和碱性亮氨酸拉链 23 (basic leucine zipper, bZIP23)蛋白靶点存在互作(图 4B)。

表 3 铁皮石斛 DoSAPK 蛋白的二级结构分析
Table 3 Analysis of secondary structure of DoSAPK proteins in *Dendrobium officinale*

Protein name	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
DoSAPK1	31.96	15.25	5.28	47.51
DoSAPK2	42.62	14.48	5.57	37.33
DoSAPK3	38.94	19.03	6.19	35.84
DoSAPK4	40.05	14.47	4.65	40.83
DoSAPK5	36.97	16.67	6.67	39.70
DoSAPK6	42.81	15.27	5.39	36.53
DoSAPK7	44.32	13.57	5.26	36.84
DoSAPK8	38.29	15.98	6.34	39.39

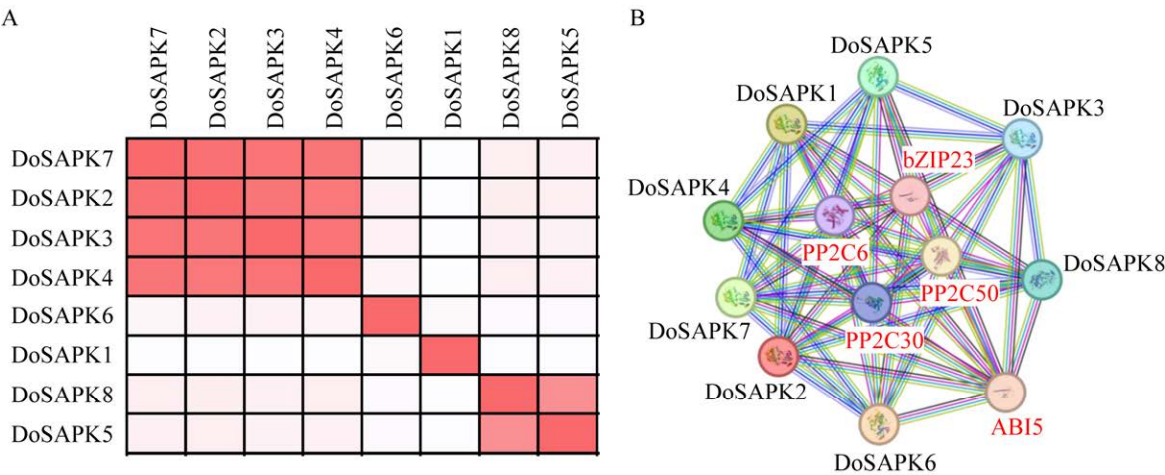


图 4 铁皮石斛 DOSAPK 家族蛋白的序列同源性及其互作分析
Figure 4 Analysis of homology and protein-protein interaction of DoSAPK family members in *Dendrobium officinale*. A: Sequence homology of DOSAPK family members. B: Protein-protein interaction of DoSAPK family members.

2.7 铁皮石斛 *DoSAPK* 基因家族顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 网站预测了铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因启动区域的顺式元件及其参与植物激素和逆境胁迫应答的生物学功能,在 *DoSAPK1-DoSAPK8* 基因的启动子区域找到 10 种顺式元件(干旱诱导、防御诱导、厌氧诱导、胁迫响应、低温响应、脱落酸响应、水杨酸响应、茉莉酸响应、赤霉素响应、生长素响应),并标注了它们的数量及位置分布(图 5)。结果显示, *DoSAPK* 家族成员含有 3-9 种顺式元件, *DoSAPK4* 启动子上存在 9 种顺式元件(生长素除外),而 *DoSAPK4* 启动子上仅含 3 种顺式元件。所有 *DoSAPK* 成员启动子上均含有胁迫响应元件, 87.5% 的成员启动子上含有脱落酸响应元件(*DoSAPK5* 除外), 5 个成员启动子上含有低温响应元件。

2.8 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因的组织表达特性分析

为了明晰铁皮石斛 *DoSAPK* 成员在不同组织中的表达特征,通过 qRT-PCR 检测了 8 个 *DoSAPK* 家族基因在铁皮石斛花蕾 (flower

bud)、萼片 (sepal)、唇瓣 (labellum)、花粉 (pollinium)、合蕊柱 (gynostemium)、茎 (stem)、叶 (leaf)、根 (root)、绿色根尖 (green root tip)、白色气生根 (white part root) 的表达情况(图 6),结果显示, *DoSAPK* 家族成员在所有组织中均有表达,但具有组织表达特异性且成员间的表达水平存在差异, *DoSAPK2* 和 *DoSAPK5* 在茎中的表达最高, *DoSAPK1* 在叶中的表达最高, *DoSAPK3*、*DoSAPK4* 分别在根部的根、根尖中表达最高, *DoSAPK6*、*DoSAPK7*、*DoSAPK8* 分别在花器官的唇瓣、合蕊柱、叶片中表达最高,暗示它们在不同组织发育中可能起重要的作用。

2.9 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因在低温处理下的表达分析

由于 *DoSAPK* 家族成员的启动子上含有大量逆境响应元件(图 5),因此分析了 *DoSAPK* 家族基因在低温处理下的表达水平(图 7),结果显示, 3 个基因(*DoSAPK1*、*DoSAPK2*、*DoSAPK8*)在低温处理后呈现上调表达;其余 5 个基因(*DoSAPK3*、*DoSAPK4*、*DoSAPK5*、*DoSAPK6*、*DoSAPK7*)在低温处理后呈现下调表达。

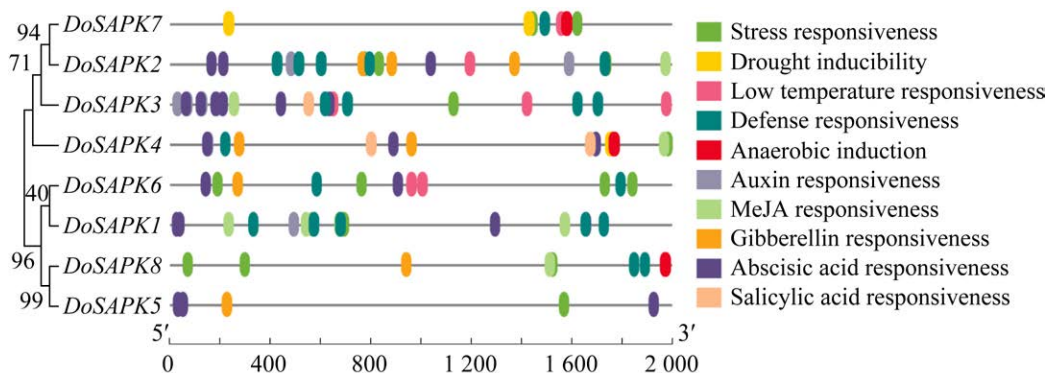


图 5 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因启动子的顺式作用元件分析

Figure 5 Analysis of *cis*-regulatory elements on the promoters of *DoSAPK* family in *Dendrobium officinale*.

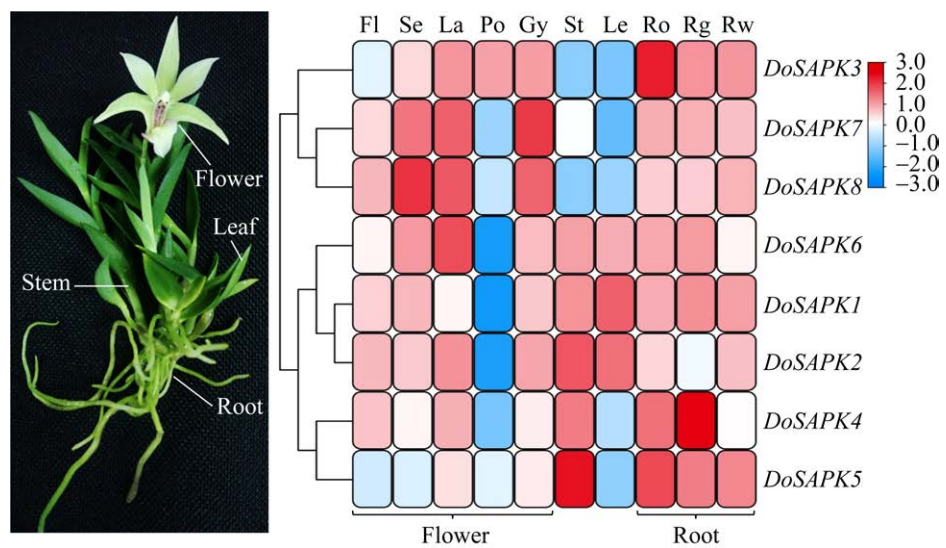


图 6 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因的组织表达分析
Figure 6 Tissue-specific expression of *DoSAPK* family genes in *Dendrobium officinale*. Fl: Flower bud. Se: Sepal. La: Labellum. Po: Pollinium. Gy: Gynostemium. St: Stem. Le: Leaf. Ro: Root. Rg: Green root tip. Rw: White part root.

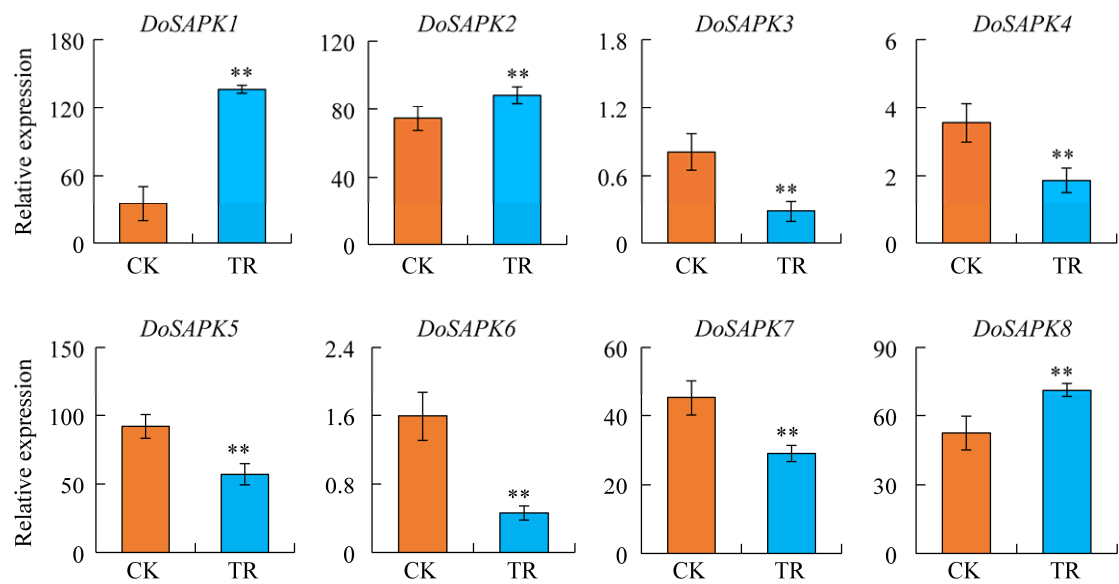


图 7 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因在低温处理下的表达水平
Figure 7 Expression levels of *DoSAPK* family under low-temperature stress in *Dendrobium officinale*. Significances ($P<0.01$) were marked with asterisk (**). CK: Control (25 °C). TR: Treatment (0 °C).

2.10 铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因在盐胁迫处理下的表达分析

与此同时，分析了铁皮石斛叶片和根系中 *DoSAPK* 家族基因响应盐胁迫处理的表达水平 (图 8 和图 9)，结果显示，盐胁迫处理下，*DoSAPK7*

在叶或根中的表达量均没有显著性差异。在叶片中，共有 4 类基因表达的模式：2 个基因 (*DoSAPK4*、*DoSAPK6*) 呈现不断上调表达；*DoSAPK3* 呈现先增加后减少的表达趋势；4 个基因 (*DoSAPK1*、*DoSAPK2*、*DoSAPK5*、*DoSAPK8*)

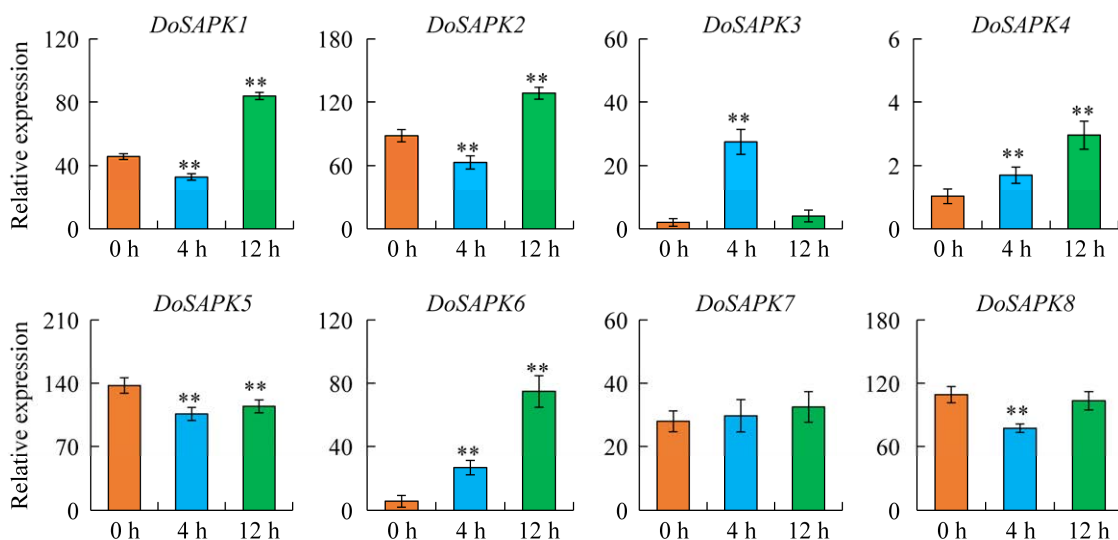


图8 铁皮石斛叶中 *DoSAPK* 家族基因在盐胁迫处理下的表达分析

Figure 8 Tissue-specific expression of *DoSAPK* family genes in *Diendrobium officinale* leaves. Significances ($P < 0.01$) were marked with asterisks (**).

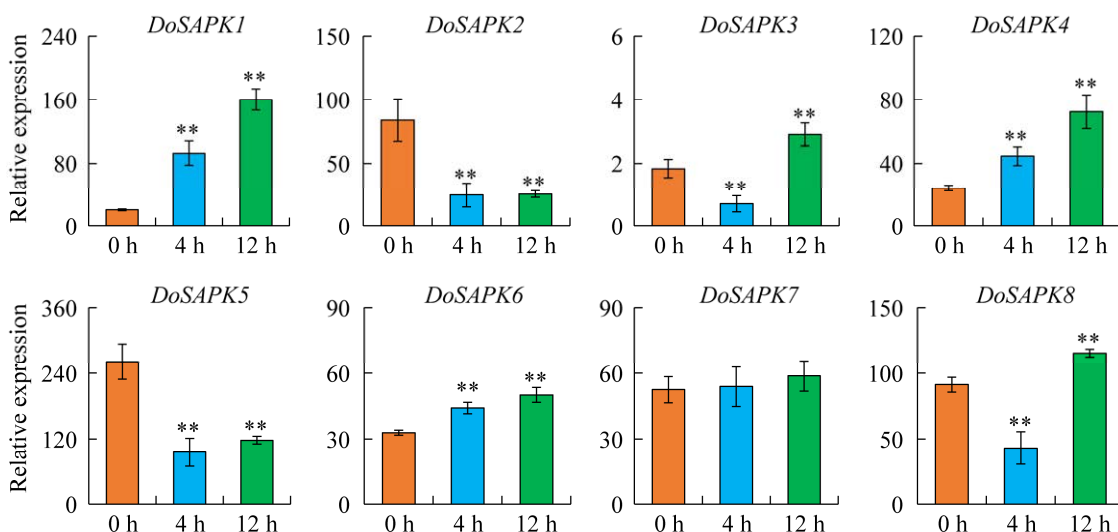


图9 铁皮石斛根中 *DoSAPK* 家族基因在盐胁迫处理下的表达分析

Figure 9 Tissue-specific expression of *DoSAPK* family genes in *Dendrobium officinale* roots. Significances ($P < 0.01$) were marked with asterisks (**).

呈现先减少后增加的表达趋势。在根中，3 个基因 (*DoSAPK1*、*DoSAPK4*、*DoSAPK6*) 呈现不断上调表达，3 个基因 (*DoSAPK3*、*DoSAPK5*、*DoSAPK8*) 呈现先减少后增加的表达趋势。

3 讨论与结论

为了适应持续变化的不利条件，植物进化出应对逆境胁迫的响应机制，激活相应基因表达来协调生长与防御^[7]。SAPK 是一类植物特异

的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶,通过磷酸化修饰调控靶蛋白活性,在植物生长发育、代谢产物合成和环境胁迫应答中发挥关键作用^[15-16]。本研究共在铁皮石斛基因组中鉴定到8个 *DoSAPK* 家族成员,比拟南芥(10个)^[8]、水稻(10个)^[9]、薄壳山核桃(13个)^[11]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*; 20个)^[31]中的数量少,比甜菜(*Beta vulgaris* L.; 6个)^[32]、甜樱桃(*Prunus avium* L.; 6个)^[33]中的数量多,表明铁皮石斛中的 *SAPK* 成员数量适中,可能与铁皮石斛普遍适应低温、干旱、强光照等逆境的需求相关。此外,8个 *DoSAPK* 成员分布在7条染色体上,每条染色体上含有1-2个成员,并存在1对串联复制基因(*DoSAPK2* 和 *DoSAPK7*),该基因重复事件可能是由染色体片段复制事件引起的^[21],也可能是由单基因复制(转座、逆转录转座等)事件引起的。

铁皮石斛8个 *DoSAPK* 成员的氨基酸平均数为338,分子量平均值为38.66 kDa, pI 平均值5.74,与其他物种中 *SAPK* 蛋白分子量约40 kDa 且为酸性蛋白质氨基酸(pI<7.0)相一致^[3],表明 *SAPK* 家族蛋白在植物中相对保守。*DoSAPK* 家族蛋白均是亲水蛋白,暗示它们在响应环境胁迫应答中发挥重要的作用,二级结构以具有刚性的 α -螺旋为主(平均占比39.50%),为蛋白质的构象提供支撑力^[10]。

DoSAPK 家族成员分为 group I、group II 和 group III 这三大亚家族,与单子叶玉米、藜麦亲缘关系相对较近,与双子叶拟南芥、绿豆、马铃薯亲缘关系相对较远,与早期植物 *SAPK* 蛋白进化为两支的观点相一致^[16]。单子叶与双子叶植物中的 *SAPK* 成员在进化上相对独立且保守,具有不同的路径和进化趋势,进而呈现2个相对独立的平行进化类群^[11]。*DoSAPK* 蛋白序列的 N 端高度保守,具有2个保守结构

域:蛋白激酶激活位点(motif 1)和 ATP 结合位点(motif 3),是 *DoSAPK* 激活所必需的^[32]。C 端序列的变异性较大,含有受逆境胁迫的结构域 I (motif 7)和受 ABA 诱导的结构域 II (motif 10),它们是导致 *SAPK* 蛋白功能多样性和复杂性的基础^[34]。

启动子区域存在大量的顺式作用元件,对基因的转录和表达具有显著影响。多种非生物(高盐、低温、干旱)逆境能诱导 *SAPK* 基因的表达,其启动子上游的顺式元件对其表达量起着至关重要的影响^[4]。铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因启动子区域富集了大量脱落酸、茉莉酸等激素响应元件,以及低温、干旱诱导等逆境响应元件。各个成员包含的元件数量与种类也存在差异,推测铁皮石斛 *DoSAPK* 家族基因的表达可能与激素诱导及抗逆应答有关,与水稻^[35]、甜菜^[32]、甜樱桃^[33]等 *SAPK* 蛋白响应非生物胁迫相一致。低温促进铁皮石斛叶中3个 *DoSAPK* 基因显著上调表达,盐胁迫处理促进铁皮石斛叶中5个 *DoSAPK* 基因显著上调表达,根中5个 *DoSAPK* 基因显著上调表达。非生物逆境(低温、盐渍)处理下,植物内源 ABA 与受体蛋白 PYR/PYL 结合后,解除磷酸酶 PP2C 对激酶 *SAPK* 活性的抑制,激活 *SAPK* 的表达,进而激活 ABA 响应基因的表达,提升植物的耐冷、耐盐性^[6,35]。有趣的是,铁皮石斛叶中高表达的 *DoSAPK1* 基因同时被低温和盐胁迫处理诱导表达,这与该基因的启动子区域鉴定到的低温响应、防御与胁迫元件相吻合,具体分子机制有待进一步研究。

本研究从全基因组水平鉴定出铁皮石斛 *SAPK* 家族成员,对其理化性质、系统进化、染色体定位、基因结构、顺式元件和保守基序进行了分析,并分析了 *DoSAPK* 家族基因在不同组织、低温及盐胁迫下的表达,为解析 *DoSAPK*

基因在铁皮石斛生长发育及逆境应答中的功能提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] 唐丽, 王朝勇, 龙华, 李菁, 陈功锡, 周强. 环境因子对铁皮石斛生长发育及药效成分含量的影响[J]. 中药材, 2019, 42(2): 251-255.
TANG L, WANG CY, LONG H, LI J, CHEN GX, ZHOU Q. Effects of environmental factors on growth and development and effective component contents in *Dendrobium officinale*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(2): 251-255 (in Chinese).
- [2] 陈晓梅, 田丽霞, 单婷婷, 孙乐, 郭顺星. 铁皮石斛种质资源和遗传育种研究进展[J]. 药学报, 2018, 53(9): 1493-1503.
CHEN XM, TIAN LX, SHAN TT, SUN L, GUO SX. Advances in germplasm resources and genetics and breeding of *Dendrobium officinale*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(9): 1493-1503 (in Chinese).
- [3] 刘子茜, 朱雅欣, 伍国强, 魏明. SnRK2在植物响应逆境胁迫和生长发育中的作用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 89-103.
LIU ZQ, ZHU YX, WU GQ, WEI M. The role of SnRK2 in the response to stress, the growth and development of plants[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 89-103 (in Chinese).
- [4] MAO XG, LI YY, REHMAN SU, MIAO LL, ZHANG YF, CHEN X, YU CM, WANG JY, LI CN, JING RL. The sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2) genes are multifaceted players in plant growth, development and response to environmental stimuli[J]. Plant and Cell Physiology, 2020, 61(2): 225-242.
- [5] SOMA F, TAKAHASHI F, SUZUKI T, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK2 kinases under drought stress[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1373.
- [6] SOON FF, NG LM, ZHOU XE, WEST GM, KOVACH A, EILEEN TAN MH, SUINO-POWELL KM, HE YZ, XU Y, CHALMERS MJ, BRUNZELLE JS, ZHANG HM, YANG HY, JIANG HL, LI J, YONG EL, CUTLER S, ZHU JK, GRIFFIN PR, MELCHER K, et al. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases[J]. Science, 2012, 335(6064): 85-88.
- [7] YU ZP, DUAN XB, LUO L, DAI SJ, DING ZJ, XIA GM. How plant hormones mediate salt stress responses[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(11): 1117-1130.
- [8] BOUDSOCQ M, BARBIER-BRYGOO H, LAURIÈRE C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(40): 41758-41766.
- [9] XU MR, HUANG LY, ZHANG F, ZHU LH, ZHOU YL, LI ZK. Genome-wide phylogenetic analysis of stress-activated protein kinase genes in rice (*OsSAPKs*) and expression profiling in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* infection[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(4): 877-885.
- [10] XING J, ZHAO RJ, ZHANG Q, HUANG XR, YIN TC, ZHANG J, XU B. Genome-wide identification and characterization of the *LpSAPK* family genes in perennial ryegrass highlight *LpSAPK9* as an active regulator of drought stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 922564.
- [11] 马文娟, 朱凯凯, 湛梦云, 赵娟, 谭鹏鹏, 彭方仁. 薄壳山核桃 *SnRK2* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(2): 18-28, 46.
MA WJ, ZHU KK, CHEN MY, ZHAO J, TAN PP, PENG FR. Identification and expression analysis of *SnRK2* gene family from *Carya illinoensis*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2023, 32(2): 18-28, 46 (in Chinese).
- [12] MAZUR R, MASZKOWSKA J, ANIELSKA-MAZUR A, GARSTKA M, POLKOWSKA-KOWALCZYK L, CZAJKOWSKA A, ZMIENKO A, DOBROWOLSKA G, KULIK A. The SnRK_{2.10} kinase mitigates the adverse effects of salinity by protecting photosynthetic machinery[J]. Plant Physiology, 2021, 187(4): 2785-2802.
- [13] HUANG XZ, HOU LY, MENG JJ, YOU HW, LI Z, GONG ZZ, YANG SH, SHI YT. The antagonistic action of abscisic acid and cytokinin signaling mediates drought stress response in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2018, 11(7): 970-982.
- [14] CHEN K, LI GJ, BRESSAN RA, SONG CP, ZHU JK, ZHAO Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and

- functions in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1): 25-54.
- [15] KAWA D, MEYER AJ, DEKKER HL, ABD-EL-HALIEM AM, GEVAERT K, van de SLIJKE E, MASZKOWSKA J, BUCHOLC M, DOBROWOLSKA G, de JAEGER G, SCHUURINK RC, HARING MA, TESTERINK C. SnRK2 protein kinases and mRNA decapping machinery control root development and response to salt[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(1): 361-377.
- [16] 庞彩红, 李双云, 夏阳, 杨勇, 杨庆山, 臧真荣, 刘慰, 亓玉昆, 刘盛芳. 植物非 ABA 依赖型 SnRK2 研究进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(1): 19-24.
- PANG CH, LI SY, XIA Y, YANG Y, YANG QS, ZANG ZR, LIU Y, QI YK, LIU SF. Research progress of plant ABA-independent SnRK2[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(1): 19-24 (in Chinese).
- [17] LOU DJ, WANG HP, LIANG G, YU DQ. OsSAPK2 confers abscisic acid sensitivity and tolerance to drought stress in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 993.
- [18] JIA MR, MENG XB, SONG XG, ZHANG DH, KOU LQ, ZHANG JH, JING YH, LIU GF, LIU HH, HUANG XH, WANG YC, YU H, LI JY. Chilling-induced phosphorylation of IPA1 by OsSAPK6 activates chilling tolerance responses in rice[J]. *Cell Discovery*, 2022, 8: 71.
- [19] NIU ZT, ZHU F, FAN YJ, LI C, ZHANG BH, ZHU SY, HOU ZY, WANG MT, YANG JP, XUE QY, LIU W, DING XY. The chromosome-level reference genome assembly for *Dendrobium officinale* and its utility of functional genomics research and molecular breeding study[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(7): 2080-2092.
- [20] YU ZM, ZHANG GH, TEIXEIRA da SILVA JA, LI MZ, ZHAO CH, HE CM, SI C, ZHANG MZ, DUAN J. Genome-wide identification and analysis of DNA methyltransferase and demethylase gene families in *Dendrobium officinale* reveal their potential functions in polysaccharide accumulation[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 21.
- [21] ZHANG MZ, LIU N, TEIXEIRA da SILVA JA, LIU XC, DENG RF, YAO YX, DUAN J, HE CM. Physiological and transcriptomic analysis uncovers salinity stress mechanisms in a facultative crassulacean acid metabolism plant *Dendrobium officinale*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1028245.
- [22] LU SN, WANG JY, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, GEER RC, GONZALES NR, GWADZ M, HURWITZ DI, MARCHLER GH, SONG JS, THANKI N, YAMASHITA RA, YANG MZ, ZHANG DC, ZHENG CJ, LANCZYCKI CJ, MARCHLER-BAUER A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D265-D268.
- [23] POTTER SC, LUCIANI A, EDDY SR, PARK Y, LOPEZ R, FINN RD. HMMER web server: 2018 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [24] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [25] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [26] ZHANG GQ, LIU KW, LI Z, LOHAUS R, HSIAO YY, NIU SC, WANG JY, LIN YC, XU Q, CHEN LJ, YOSHIDA K, FUJIWARA S, WANG ZW, ZHANG YQ, MITSUDA N, WANG MN, LIU GH, PECORARO L, HUANG HX, XIAO XJ, et al. The *Apostasia* genome and the evolution of orchids[J]. *Nature*, 2017, 549: 379-383.
- [27] PERTEA M, KIM D, PERTEA GM, LEEK JT, SALZBERG SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11: 1650-1667.
- [28] 郑飞雄, 陈俊宇, 江林琪, 赵佳莹, 吕嘉怡, 俞振明. 掌叶覆盆子 *4CL* 基因家族鉴定及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(2): 311-321.
- ZHENG FX, CHEN JY, JIANG LQ, ZHAO JY, LV JY, YU ZM. Genome-wide identification and expression analysis of *4CL* gene family in *Rubus chingii* Hu[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(2): 311-321 (in Chinese).
- [29] YU ZM, ZHANG GH, TEIXEIRA da SILVA JA, ZHAO CH, DUAN J. The methyl jasmonate-responsive transcription factor DobHLH4 promotes *DoTPS10*, which is involved in linalool biosynthesis in

- Dendrobium officinale* during floral development[J]. Plant Science, 2021, 309: 110952.
- [30] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] LIU Z, GE XY, YANG ZR, ZHANG CJ, ZHAO G, CHEN EY, LIU J, ZHANG XY, LI FG. Genome-wide identification and characterization of *SnRK2* gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. BMC Genetics, 2017, 18(1): 54.
- [32] WU GQ, LIU ZX, XIE LL, WANG JL. Genome-wide identification and expression analysis of the *BvSnRK2* genes family in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt conditions[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2021, 40(2): 519-532.
- [33] SHEN XJ, GUO X, ZHAO D, ZHANG Q, JIANG YZ, WANG YT, PENG X, WEI Y, ZHAI ZF, ZHAO W, LI TH. Cloning and expression profiling of the *PacSnRK2* and *PacPP2C* gene families during fruit development, ABA treatment, and dehydration stress in sweet cherry[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 119: 275-285.
- [34] 张春兰, 满丽莉, 向殿军, 包乌日娜, 刘鹏. 菰蓝 *ItSnRK_{2.1}* 基因的克隆及其序列特性分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 119-128.
- ZHANG CL, MAN LL, XIANG DJ, BAO WRN, LIU P. Cloning and characteristics analysis of gene *ItSnRK_{2.1}* from *Isatis tinctoria*[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(1): 119-128 (in Chinese).
- [35] YU TY, CEN QW, KANG LH, MOU WS, ZHANG XQ, FANG YX, ZHANG X, TIAN QX, XUE DW. Identification and expression pattern analysis of the *OsSnRK2* gene family in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1088281.

(本文责编 郝丽芳)